

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570113
 研究課題名 (和文) スフィンゴミエリン代謝系酵素の構造および細胞生物学的な解析
 研究課題名 (英文) Structural and cell biological study of sphingolipid metabolic enzyme
 研究代表者
 津下 英明 (TSUGE HIDEAKI)
 徳島文理大学・健康科学研究所・教授
 研究者番号:40299342

研究成果の概要：スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、シグナル伝達分子として重要な作用を持つ。この S1P を作る酵素ヒトスフィンゴシンキナーゼ (SPHK1) の結晶構造解析を最終目標に発現、結晶化を目指す。大腸菌と蚕での発現の検討の結果、His tagged SPHK1 のインクルージョンボディからの巻き戻しを行い、0.1M のアルギニン存在下で活性を持った酵素を大量に精製した。しかしオリゴマーを取る事から巻き戻しが十分とは考えられず、この酵素から結晶化を行ったが回折を得られる結晶は得られていない。また細胞内での SPHK1 結合タンパク質の解析を行っており、新規の結果が得られつつある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：構造生物学・スフィンゴミエリン代謝酵素・スフィンゴシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

1989年にOkazakiにより始めて細胞分化のシグナル伝達機構におけるスフィンゴミエリン代謝の関与が報告されて以来、スフィンゴミエリン代謝産物の生理的な役割に関する多くの情報が蓄積されつつある。スフィンゴ脂質は従来、リン脂質と同様に膜構造の維持に関係しており、細胞生理機能とは無縁と考えられてきた。しかし近年スフィンゴ脂質は、細胞内シグナル伝達やアポトーシス誘導物

質として働く事が示された。スフィンゴミエリンは、セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン 1 リン酸と代謝される。スフィンゴシンキナーゼの産物であるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、近年になりシグナル伝達分子として重要な作用を持つ事が明らかになってきた。例えば血小板で作られた S1P は細胞外に放出され、血管上皮細胞上に存在する S1P 受容体すなわち G 蛋白共役型受容体である endothelial differentiation gene

(EDG) 1, 3 を介して情報が伝達される。
またスフィンゴリピドーシス (リソソーム酵素異常症) にこれら酵素の欠損が関わっている。タンパク質、特に機能的に重要な複合体の構造解析は生命理解のために必須な魅力ある標的である。特に哺乳類のタンパク質の場合、細菌のタンパク質の構造解析とは異なるいくつかの問題点を克服する必要がある。X 線結晶構造解析は大きな分子複合体の解析をするために十分に威力を発揮するが、そのためには、複合体タンパク質の大量に発現する必要がある。我々のグループではスフィンゴミエリン代謝系の酵素群の構造解析を目標に掲げて、複合体の構造解析のためにいくつかのアプローチを取って発現を検討してきた。特にこれらの研究でヒトスフィンゴシンキナーゼ (SPHK1) の発現、精製、結晶化および細胞内での局在化機構に焦点を当てて研究を進めてきた。

2. 研究の目的

2006 年に行ったセレウス菌スフィンゴミエリナーゼの X 線結晶構造解析 (JBC(2006)281, 16157-16167) に続いて、ヒトスフィンゴミエリン代謝系の酵素の構造を X 線結晶解析により明らかにすることを目的としている。これら酵素の結晶構造から Structure Based Drug Design (SBDD) で阻害剤の開発を最終的に目標とする。これらの阻害剤はそれぞれの酵素の機能と欠損症を理解する上での重要な鍵となる。
1998 年にラット腎臓のスフィンゴシンキナーゼはカルモジュリンとの親和性を持つ事がわかった。また 2000 年に Wattenberg のグループはヒト胎盤よりスフィンゴシンキナーゼの単離、クローニングに成功している。スフィンゴシンキナーゼが作るスフィンゴシン 1 リン酸はその受容体エッジを介して様々なシグナル伝達に関わる。我々はヒトスフィンゴシンキナーゼの発現、結晶化と細胞内での局在化を明らかにする。

3. 研究の方法

スフィンゴシンキナーゼ (SPHK1) の発現、精製、結晶化: SPHK1 の大量発現系を構築するために His tagged SPHK1 (pET15b) の大腸菌での発現を行った。また GST フュージョンでの発現の検討、さらに発現のホストを蚕に換えて発現系の検討を行った。
細胞内局在化: HEK293 細胞と神経細胞を用い SPHK1 を発現させ、膜への移行機構を明らか

にするために、SPHK1 に結合するタンパク因子の同定を nano LC MS/MS を用いて進める。

4. 研究成果

(1) SPHK1 の大量発現系を構築するために His tagged SPHK1 (pET15b) の発現を行った結果、可溶性画分に得られる SPHK1 はわずかでほとんどがインクルージョンボディとして不溶性沈殿として得られた。

(2) His tagged SPHK1 のインクルージョンボディからの巻き戻しの検討を行った。0, 1M Arg 条件下で可溶性を増し、ニッケルキレート、ゲル濾過により精製を行った。最終的にオリゴマー化した酵素が得られた。SPHK1 活性を放射ラベルしたスフィンゴシンを用いて測定した所、高い活性が得られた。しかし、Arg 濃度を下げると沈殿する事から結晶化には適していない。

(3) GST フュージョンでの発現の検討を行った。トロンビンでのカットを行う前に SPHK1 は切断されており、グルタチオンセファロースで GST のみが結合する事が判明した。

(4) 蚕を利用した発現系の検討を行った。このために、pMSNHT07 ベクターへのサブクローニングを行った。これを片倉工業に外注して発現を試みたが蚕の体液 30ml からわずかの可溶性産物しか得られなかった。この SPHK1 は活性があることを確認した。これらの発現系でインクルージョンボディからの巻き戻しをしたサンプルで濃縮を行い、5 mg/cc でインコンプリートファクトリアル法で結晶化を行ったが、回折が出る結晶は得られていない。

これらに発現の結果を全体的に判断し、今後の問題点をまとめる。(a) 巻き戻し実験で活性がある SPHK1 が得られた。この巻き戻し産物の中にどれくらい misfold 産物が含まれるか見積もりが必要になる。今後は文献で SPHK1 がカルモジュリンに結合することが報告されているためにカルモジュリンカラムで精製を検討する。(b) 巻き戻し SPHK1 の濃縮を行うと 5mg/ml でアグリゲーションがおきる。これを抑えるのが大きな課題である。この解決策としてひとつはカルモジュリンとの複合体での精製を考えている。これにより疎水面が覆われて可溶性が上がり複合体での結晶化可能な濃度までいけることは十分に想定される。(c) GST フュージョンでの発現では、発現と同時に SPHK1 が切断されているが、活性を保ったまま SPHK1 が可溶性画分に存在するのであれば此処からの精製

を検討する必要がある。
これらの問題点をさらにつめる事により、SPHK1の分子構造決定のための結晶化に向けての大量精製を成功させたいと考えている。

細胞内局在化：

nano LC MS/MS を用いて結合蛋白の解析をすることにより、今まで知られていない SPHK1 結合分子の存在が明らかになってきた。この新たに得られた分子は興味あるものであったが再現性を得られるか、現在、確認を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Tsuge H., Yoneda K. *et al.*, Crystal structure of archaeal highly thermostable L-aspartate dehydrogenase/NAD/citrate ternary complex., *FEBS Journal.*, 274-16, 4315-4325, 2007, 査読 (有)
- ② Tsuge H., Sakuraba H. *et al.*, Sequential aldol condensation catalyzed by hyperthermophilic 2-deoxy-d-ribose-5-phosphate aldolase., *Appl Environ Microbiol.*, 73-22, 7427-7434, 2007, 査読 (有)
- ③ Tsuge H., Kawazoe T. *et al.*, Human D-amino acid oxidase: an update and review., *Chem Rec.*, 7-5, 305-315, 2007, 査読 (有)
- ④ Tsuge H., Imagawa T. *et al.*, Crystal structure of the YdiC-family protein TTHB029 from *Thermus thermophilus* HB8: Structural relationship with peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase., *Biochem Biophys Res Commun.*, 367-3, 535-541, 2008, 査読 (有)
- ⑤ Tsuge H., Sakuraba H., Katunuma N. *et al.*, Structure of L-aspartate oxidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*., *Biochim Biophys Acta.*, 1784-3, 563-571, 2008, 査読 (有)
- ⑥ Tsuge H., Nagahama M., Oda M., Sakurai J. *et al.*, Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota-toxin., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 105-21, 7399-7404, 2008, 査読 (有)
- ⑦ Tsuge H., Katunuma N., Sakuraba H. *et*

al., Structure of an archaeal alanine:glyoxylate aminotransferase., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 64-6, 696-699, 2008, 査読 (有)

- ⑧ Tsuge H., Nakaishi Y., Bando M. *et al.*, Structural analysis of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase, a key regulator in type 2 diabetes., *FEBS Lett.*, 583-1, 163-167, 2008, 査読 (有)
 - ⑨ Tsuge H., Tsukamoto S., Yamashita T. *et al.*, Non-native alpha-helix formation is not necessary for folding of lipocalin: Comparison of burst-phase folding between tear lipocalin and beta-lactoglobulin., *Proteins.*, In press 2008, 査読 (有)
 - ⑩ Tsuge H., Kuzuhara T., Kise D. *et al.*, Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue., *J Biol Chem.*, 284-11, 6855-6860, 2009, 査読 (有)
 - ⑪ Tsuge H., Kuzuhara T., Kise D. *et al.*, Crystallization and X-ray diffraction analysis of RNA-primer/promoter-binding domain of influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase PB2., *Acta Crystallographica sect F Struct Biol Cryst Commun.*, 1-65, 144-146, 2009, 査読 (有)
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Tsuge H., Kawazoe T., Fukui K., Crystallographic Study of Human D-Amino Acid Oxidase: Structural Basis of D-DOPA Oxidation., THE 21st SYMPOSIUM OF THE PROTEIN SOCIETY, 21-25 July, 2007, Boston, Massachusetts
 - ② Tsuge H., Substrate recognition of ADP-ribosylating toxins., Brookhaven National Laboratory, 25-29 July, 2007, New York
 - ③ Tsuge H., Imagawa T. *et al.*, Crystal structure of the YdiC family protein TTHB029 from *Thermus thermophilus* HB8 revealed structural similarity with peptidoglycan deacetylase., ISDSB2007(The 2nd International Symposium on Diffraction Structure Biology 2007), 10-13 September, 2007, Tower Hall Funabori, Tokyo, Japan
 - ④ Tsuge H., Kobayashi H. *et al.*, Crystal

structure of *Aeromonas sobria* serine protease, prototype kexin/furin protease:the extra occluding domain regulates protein substrate specificity., 5th General Meeting of the International Proteolysis Society(IPS2007), 20-24 October, 2007, Patras, Greece

- ⑤津下英明, ADP リボシル化酵素とフラビン酵素の構造機能相関, 第 410 回ビタミン B 研究協議会, 平成 19 年 11 月 17 日, 京大会館 (京都市)
- ⑥津下英明, 小田真隆, 櫻井純 等, アルギニンADP リボシル化の毒素のアクチン認識分子機構, 第 45 回日本生物物理学会年会, 平成 19 年 12 月 21~23 日, パシフィコ横浜会議センター (横浜市)
- ⑦津下英明, 「X 線結晶構造解析と質量分析による生理活性タンパク質の構造機能相関の研究」『複合体タンパク質 X 線結晶構造から見る酵素反応機能』, 徳島文理大学・健康科学研究所・私学助成研究発表会, 平成 20 年 1 月 26~27 日, 徳島文理大学 徳島校 (徳島市)
- ⑧津下英明, 宇都宮敬子 等, *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼの結晶構造解析, 日本生物物理学会第 1 回中国四国支部大会, 平成 20 年 5 月 10~11 日, 高知大学朝倉キャンパス (高知市)
- ⑨ Tsuge H., Novel Family of Diflavin Enzyme:Crystal Structure of Archaeal L-Proline Dehydrogenase and the Industrial Application., BIT's 1st Annual World Congress of ibio 2008, 18-21 May, 2008, New Century Grand Hotel Hangzhou, China
- ⑩津下英明, タンパク質・ペプチド研究の現状と展望ー「アルギニン特異的 ADP リボシル化毒素とアクチン複合体の X 線結晶構造解析」, 第 18 回 WS フォーラム 和光純薬工業 (株) 福岡営業所, 平成 20 年 11 月 21 日, 九州大学医系地区コラボセンター (福岡市)
- ⑪津下英明, 「アルギニン特異的 ADP リボシル化毒素とアクチン複合体の X 線結晶構造解析」, 北海道大学生体高分子シンポジウム, 平成 20 年 12 月 19 日, 北海道大学 (札幌市)
- ⑫津下英明, 「X 線結晶構造解析と質量分析による生理活性タンパク質の構造機能相関の研究」『アルギニン特異的 ADP リボシル化毒素とアクチン複合体の X 線結晶構造解析』, 第 3 回学術フロンティアシンポジウム, 平成 21 年 2 月 28 日, 徳島文理大学 徳島校 (徳島市)

[図書] (計 1 件)

- ①倉光成紀, 杉山政則 編, 津下英明 等, 構造生物学ーポストゲノム時代のタンパク質研究ー, 2007 年, 総ページ数 261 ページ

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ
<http://inetsrv103.bunri-u.ac.jp/kenkou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津下 英明 (TSUGE HIDEAKI)
徳島文理大学・健康科学研究所・教授
研究者番号:40299342

(2) 研究分担者

勝沼 信彦(KATUNUMA NOBUHIKO)
徳島文理大学・健康科学研究所・教授
研究者番号:50035375
小田 真隆 (ODA MASATAKA)
徳島文理大学・薬学部・助教
研究者番号:00412403
櫻井 純 (SAKURAI JUN)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号:80029800

(3) 連携研究者

なし